

91 例 EB 病毒相关疾病儿童血浆 EB 病毒 DNA 的检测

段红梅¹,姚瑶²,谢正德²,闫静²,胡英慧²,么远²,周玲³,申昆玲²

(1. 北京中医药大学护理学院,北京 100102; 2. 首都医科大学附属北京儿童医院,北京 100045;
3. 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所肿瘤实验室,北京 100052)

〔摘 要〕 目的 了解 EB 病毒(EBV)感染患儿外周血血浆中游离 EBV DNA 的拷贝数,确定 EBV 原发感染后外周血血浆中 EBV 游离 DNA 的拷贝数与发病天数及病情轻重的关系。方法 应用荧光定量 PCR 方法,测定 73 例 EBV 原发感染和 18 例 EBV 相关重症疾病患儿外周血血浆中 EBV 游离 DNA。结果 ①原发 EBV 感染患儿外周血血浆中 EBV 游离 DNA 随发病天数呈下降趋势,发病 2 周后很难检测到。②EBV 相关重症疾病组患儿外周血血浆中 EBV 游离 DNA 阳性率明显高于原发 EBV 感染组,差异有显著性(89% vs 16%, $P < 0.05$)。结论 原发 EBV 感染后随病程天数的增加,病毒复制水平逐渐下降。血浆中 EBV 游离 DNA 检测对评价 EBV 相关疾病的严重程度有一定参考价值。

〔中国当代儿科杂志,2009,11(11):897-900〕

〔关 键 词〕 EB 病毒;慢性活动性 EB 病毒感染;噬血细胞性淋巴组织细胞增生症;传染性单核细胞增多症;儿童

〔中图分类号〕 R373;R446.1 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1008-8830(2009)11-0897-04

Determination of plasma EBV DNA in 91 children with EBV-associated diseases

DUAN Hong-Mei, YAO Yao, XIE Zheng-De, YAN Jing, HU Ying-Hui, YAO Yuan, ZHOU Ling, SHEN Kun-Ling. College of Nursing, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100102, China (Shen K-L, Email:kunlingshen@hotmail.com)

Abstract: Objective To determine the plasma level of Epstein-Barr virus (EBV) DNA in children with EBV-associated diseases, and to investigate the dynamic changes of EBV DNA level after initial infection as well as the relationship between EBV-DNA level and the diseases severity. **Methods** The subjects consisted of 73 children with primary EBV infection (infectious mononucleosis, pneumonia, etc.) and 18 children with severe EBV-associated diseases (chronic active EBV infection, hemophagocytic lymphohistiocytosis, etc.). The plasma EBV DNA level was detected by a real-time PCR assay. **Results** The plasma EBV DNA level decreased with the infection time in children with primary EBV infection. Two weeks after infection, plasma EBV DNA was almost undetectable. The positive rate of plasma EBV DNA in children with severe EBV-associated diseases increased significantly when compared with that in children with primary EBV infection (89% vs 16%; $P < 0.05$). **Conclusions** The level of EBV replication may be reduced with the infection time. Dynamic determination of blood EBV DNA is useful for the evaluation of disease severity in children with EBV infection.

〔Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11 (11):897-900〕

Key words: Epstein-Barr virus; Chronic active Epstein-Barr virus infection; Hemophagocytic lymphohistiocytosis; Infectious mononucleosis; Child

Epstein-Barr 病毒(EBV)属于疱疹病毒科 γ 亚科,原发感染后病毒在口咽上皮细胞内大量复制并且裂解细胞释放病毒颗粒,机体细胞免疫功能发挥清除被 EBV 感染的细胞。之后少量 EBV 潜伏在 B 淋巴细胞,随细胞周期的复制而复制,其中的部分 EBV 可再次进入裂解感染,在口咽上皮细胞内繁殖,释放病毒颗粒,但在免疫功能正常的个体,由

于 EBV 特异性细胞免疫功能的免疫监视作用,EBV 并不会大量复制导致疾病。在细胞免疫功能受损后,EBV 复制可加速^[1~3]。由于裂解感染和潜伏感染时期 EBV 表达的抗原不同,因此,测定机体针对这些抗原产生的不同类型抗体可从一定程度上反映 EBV 的感染状态。研究表明我国儿童 2 岁以前 EBV 原发感染率在 90% 以上,相关疾病主要为传染

〔收稿日期〕2009-02-14;〔修回日期〕2009-04-18
〔基金项目〕北京市科委基金(z0005190042511)、北京市教委基金(KM200710025023)及北京市自然科学基金(702026)资助。
〔作者简介〕段红梅,女,博士,讲师。主攻方向:儿童病毒感染性疾病。
〔通讯作者〕申昆玲,女,教授,首都医科大学附属北京儿童医院,邮编:100045。

性单核细胞增多症(infectious mononucleosis, IM)或上呼吸道感染,但EBV相关重症疾病还有慢性活动性EBV感染(chronic active Epstein-Barr virus infection, CAEBV)及EBV相关噬血细胞性淋巴组织细胞增生症(EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis, EBV-HLH)。近年来,这些疾病在临床逐渐被重视^[3~7],但由于EBV相关重症疾病病例数有限,并且缺乏特异性实验室诊断方法,因此,这些疾病缺乏系统研究。本研究针对EBV相关疾病患儿,应用荧光定量PCR测定EBV的拷贝数,同时应用间接免疫荧光法检测4项EBV抗体,即抗病毒衣壳抗原(viral capsid antigen, VCA)IgG及IgM,EBV的早期抗原(early antigen, EA)IgG, EBV核抗原(nuclear antigen, EBNA)IgG。

1 资料和方法

1.1 病例来源及标本

全部病例为2002年4月至2006年10月,首都医科大学附属北京儿童医院收治的经EBV抗体4项确定为EBV感染的儿童。其中原发EBV感染组包括73例经EBV抗体4项检查确定为EBV原发感染儿童,65例临床诊断为IM,8例诊断为肺炎或上呼吸道感染。

EBV相关重症疾病组包括18例临床诊断为CAEBV、EBV-HLH及原发性血小板减少性紫癜(ITP)等的病例,且上述病例VCA-IgM阳性或阴性,但VCA-IgG抗体滴度>1:320。

健康对照组选自健康成人,并经EBV抗体检测VCA-IgM均为阴性。

血清或血浆标本为患儿入院时采集,分离血清或血浆,-20℃冻存。

1.2 相关疾病的临床诊断

IM诊断标准:以《实用儿科学》第7版中的诊断标准为依据,根据临床表现、周围血象和血清学检查确诊^[8]。

HLH的诊断标准^[6]:①发热;②脾脏肿大;③外周血细胞减少,至少2系血细胞受累:血红蛋白<90 g/L,血小板<100×10⁹/L,中性粒细胞<1.0×10⁹/L;④高甘油三酯血症和(或)低纤维蛋白原血症;⑤骨髓、脾脏或淋巴结中有噬血现象;⑥血清铁蛋白≥500 mg/L。

CAEBV病例符合下列诊断标准^[4,7]:①临床表现为反复发作的IM或长期不规则发热伴多器官功能损害等;②EBV抗体4项提示为既往感染且EBV-

VCA-IgG抗体滴度增高或EBV-EA-IgG阳性或EBV-DNA为阳性;③病理标本中可见到大量含EBV编码小RNA的细胞,即EBER阳性细胞。

1.3 实验室检查方法

1.3.1 血清中4项EBV抗体检测 EBV抗体4项采用欧蒙实验诊断公司生产的抗EBV抗体血清学检测生物薄片试剂检测,为间接免疫荧光法。

原发EBV感染的诊断标准:VCA-IgM阳性和(或)VCA-IgG为低亲合力抗体,且EBNA-IgG阴性。

1.3.2 外周血浆中EBV-DNA荧光定量PCR检测

EBV-DNA荧光定量检测试剂盒为广州中山大学达安基因股份公司生产,最低检测灵敏度是1拷贝/mL,以病毒拷贝数>10拷贝数/mL计为阳性。仪器采用icycler实时荧光定量PCR仪。

1.3.3 EBER阳性细胞的检测 EBV相关重症疾病组中14例取淋巴结活检,应用EBV编码的小RNA原位杂交技术检测淋巴组织中EBER阳性细胞。

1.4 统计学分析方法

用SPSS 13 for Windows软件进行统计分析。

①借助数学软件Matlab展示血浆中EBV DNA拷贝数与发病天数之间的关系。②用盒形图对3组数据进行整体对比分析。③对3组血浆中EBV DNA的阳性率进行显著性检验。

2 结果

2.1 EBV感染状态与EBV相关疾病疾病谱

上述标本经EBV抗体4项检查分为原发感染和既往感染。原发感染共73例,其中IM无肝外脏器损害61例,IM合并肝外脏器损害4例,上呼吸道感染3例,肺炎5例;既往感染共18例,其中EBV-HLH 9例,CAEBV 4例,ITP 3例,溶血性贫血1例,坏死性淋巴结炎1例。

2.2 原发EBV感染血浆中游离EBV DNA与发病天数的关系

73例原发EBV感染儿童血浆中EBV游离DNA阳性者占12例,12例阳性样本的发病天数近似呈正态分布,其中10例(83%)发病天数在14 d之内。血浆中EBV游离DNA随发病天数呈下降趋势,发病2周后很难检测到。

2.3 健康对照组及EBV相关疾病组血浆中游离DNA比较

样本按临床疾病分为3组:健康对照组25例;原发EBV感染组73例,根据EB抗体4项VCA-IgM

阳性,且抗体类型为低亲合力抗体,临床表现除肝功能损害外无其他脏器损害,包括临床诊断为IM、肺炎、上呼吸道感染的病例;EBV 相关重症疾病组18例,临床诊断包括EBV-HLH 9例,CAEBV4例,坏死性淋巴结炎1例,ITP 3例,溶血性贫血1例。

3组样本血浆中游离EBV DNA(病毒载量,VL)拷贝数分布见图1。该图显示:原发EBV感染组VL多集中在 $10^0 \sim 10^3$ 之间,取对数的中位数为0。重症EBV相关疾病组多集中在 $10^2 \sim 10^6$ 之间,取对数的中位数为3。健康对照组则基本在 10^1 以下,中位数为0。3组血浆中EBV DNA的阳性率见表1,经卡方检验,3组血浆中游离EBV DNA的阳性率差异有显著性($\chi^2 = 51.98, P < 0.01$)。3组中以EBV相关重症疾病组阳性率为最高,其次为原发EBV感染组,健康对照组最低。

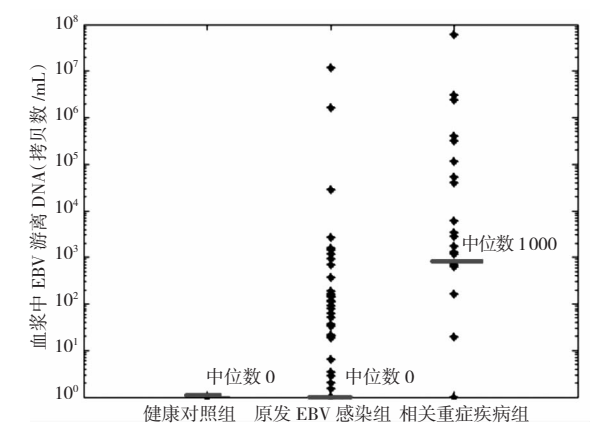


图1 血浆中EBV 游离DNA 拷贝数 3组样本中重症EBV 相关疾病组中EBV DNA 中位数最高(10^3 拷贝数/mL)。

表1 不同人群血浆中EBV 游离DNA 阳性率比较		
例(%)		
分组	例数	EBV DNA 阳性
健康对照组	25	0
原发EBV 感染组	73	12(16) ^a
EBV 相关重症疾病组	18	16(89) ^{b,c}

与健康对照组比较, a: $\chi^2 = 4.69, P < 0.05$; b: $\chi^2 = 35.43, P < 0.01$; c: 与原发EBV 感染组比较, $\chi^2 = 35.61, P < 0.01$

3 讨论

EBV 在口咽上皮细胞内复制,释放病毒颗粒后进入血循环感染B 淋巴细胞,之后潜伏在B 淋巴细胞并且处于相对静止状态,不再进行自主复制,而是随细胞周期的复制进行单拷贝复制。对于免疫功能健全的人来说,虽然原发感染后半年内唾液可能具

有感染性^[1],但由于原发感染后机体建立EBV 的特异性细胞免疫,外周血循环池中的病毒非常有限,正常健康人外周血中被EBV 感染细胞占循环池中所有淋巴细胞的 $1/10^6$ ^[1,2]。

本研究中原发EBV 感染共检测73 例,只有12 例阳性,其中10 例发病天数在病程的14 d 内,本组病人EBV DNA 阳性率低,考虑与所采样本中的多数患儿已在院外治疗多日,病毒载量可能已下降至检测范围以下有关,与Berger 等^[9]报道,IM 患者血清中EBV 游离DNA 的高峰是在症状出现的7 d 内,或病程中症状最明显的时期,随症状缓解血清中EBV 游离DNA 逐渐下降的结论一致。由此结论提示临床治疗IM 时应在病程早期给予抗病毒治疗,是否可根据外周血中EBV 载量来指导临床抗病毒治疗,值得进一步探讨。

在重症EBV 相关疾病时,由于机体免疫功能发生改变或机体对EBV 的免疫应答异常,EBV 特异性细胞免疫功能和病毒平衡被打乱,病毒复制可加速^[2,4,5,10]。在本研究中EBV 相关重症疾病组多数病例为既往感染,其血浆中EBV 游离DNA 阳性率为89%,明显高于原发EBV 感染组,可能与细胞免疫功能的受损,潜伏感染后的EBV 重新激活大量复制有关。另外,临床可根据针对EBV 不同抗原抗体的出现及抗体的类型推断出个体所处的感染时相,如VCA-IgM 阴性, VCA-IgG 阳性,EBNA-IgG 阳性,往往表示个体的EBV 既往感染。如果上述情况下VCA-IgM 转为阳性或(和)EA-IgG 阳性,则表示该个体可能存在病毒的再激活而出现大量复制。但在原发免疫缺陷或继发性免疫功能受抑制时,抗体的种类和表达水平可能与免疫健全个体不同^[3,6,7]。本研究中有2 例EBV-HLH 患儿VCA-IgM 阴性, VCA-IgG 阳性,同时EBV DNA 均在 10^5 以上,提示EBV 的既往感染及EBV 再激活后的大量复制,而该2 例患儿与病毒复制有关的VCA-IgM 及反映既往感染的EBNA-IgG 均为阴性,提示患儿可能存在对EBV 的免疫应答异常,某些EBV 抗体缺如或延迟出现^[10]。

本研究显示,EBV 原发感染时患儿多表现为IM 或呼吸道感染,而既往感染后病毒再激活复制加速相对应的疾病有:EBV-HLH、CAEBV、坏死性淋巴结炎、溶血性贫血及ITP。在EBV 相关重症疾病组中,CAEBV(4 例)及EBV-HLH(9 例)占该组的72%,本组中的EBV-HLH 多数为初诊的活动期患儿。与原发EBV 感染组相比,EBV 相关重症疾病组中血浆游离EBV DNA 阳性率高,且其拷贝数亦较高,与文

献报道一致^[4,11]。另外,虽然在一些基因缺陷性疾病(如家族性噬血细胞性淋巴组织细胞增生症及X-连锁淋巴组织增生症),EBV的原发感染可引起HLH,但本组HLH患儿均为EBV的既往感染,可能与上述疾病患病率低及本组样本例数少有关。

血浆或血清中游离EBV DNA标本来源简单易得,在缺乏病理标本(无法检测EBER阳性细胞)的HLH的病因诊断方面有很大应用价值,同时文献报道血浆或血清中游离EBV DNA还与器官损害程度及疾病种类、疾病的严重度及病死率呈正相关^[11,14];本组中的2例HLH,病情缓解后复查血清中游离EBV DNA均有明显下降。另外,在诊断CAEBV时,由于部分患儿EBV抗体滴度的增高不明显,故使用传统的血清学检查可使部分患儿漏诊,目前国外的研究推荐使用外周血中的EBV载量作为诊断标准之一^[4,7,13~15]。因此,外周血中EBV DNA的检测在EBV相关重症疾病的诊断及疗效监测中具有较强的实用性。

关于血浆或血清中EBV游离DNA的来源目前尚不明确,多数认为可能来源于破裂的EBV感染细胞。Ryan等^[16]最近在IM患者的血浆标本的荧光定量PCR反应实验中发现,这些标本中的DNA经DNaseI处理后并不能阻断其PCR反应,表明IM患者血浆中的DNA系被EBV颗粒包裹的DNA;而在免疫缺陷EBV引起的重症疾病患者血浆标本中的EBV DNA为裸露的DNA。另外,基因型频率的实验亦证实IM时被颗粒包裹的EBV DNA并不来源于单个核细胞^[13],具体来源尚有待进一步探讨。

[参 考 文 献]

[1] Fafi-Kremer S, Morand P, Brion JP, Pavese P, Baccard M, Ger-
mi R, et al. Long-term shedding of infectious epstein-barr virus af-
ter infectious mononucleosis [J]. J Infect Dis, 2005, 191(6):
985-989.

[2] Cohen JL. Epstein-Barr virus infection[J]. N Engl J Med, 2000,
343(7):481-492.

[3] 段红梅,谢正德,申昆玲. 慢性活动性EB病毒感染的研究进
展[J]. 临床儿科杂志,2007,25(2):153-156.

[4] Kimura H, Hoshino Y, Kanegane H, Tsuge I, Okamura T, Kawa
K, et al. Clinical and virologic characteristics of chronic active
Epstein-Barr virus infection[J]. Blood, 2001, 98(2):280-286.

[5] 谢正德,段红梅,张辉,闫静,刘亚谊,申昆玲. 儿童EB病毒相
关性噬血淋巴组织细胞增生症的病毒学特征[J]. 首都医科
大学学报,2005,26(5):568-570.

[6] 段红梅,谢正德,申昆玲. EB病毒相关组织淋巴细胞增生性噬
血综合征研究进展[J]. 临床儿科杂志,2005,23(7):425-430.

[7] 段红梅,申昆玲. 慢性活动性EB病毒感染的诊断标准和治疗
[J]. 实用儿科临床杂志,2006,21(10):638-640.

[8] 陆华,诸美瞻,胡亚美. 传染性单核细胞增多症[M]. //胡亚
美,江载芳. 诸福棠实用儿科学. 上册. 第7版. 北京:人民卫
生出版社,2002,821-825.

[9] Berger C, Day P, Meier G, Zingg W, Bossart W, Nadal D. Dy-
namics of Epstein-Barr virus DNA levels in serum during EBV-as-
sociated disease[J]. J Med Virol, 2001, 64(4):505-512.

[10] Kasahara Y, Yachie A. Cell type specific infection of Epstein-Barr
virus (EBV) in EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocyto-
sis and chronic active EBV infection[J]. Crit Rev Oncol Hema-
tol, 2002, 44(3):283-294.

[11] Teramura T, Tabata Y, Yagi T, Morimoto A, Hibi S, Imashuku
S. Quantitative analysis of cell-free Epstein-Barr virus genome
copy number in patients with EBV-associated hemophagocytic lym-
phohistiocytosis[J]. Leuk Lymphoma, 2002, 43(4):173-179.

[12] Imashuku S. Clinical features and treatment strategies of Epstein-
Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis[J]. Crit
Rev Oncol Hematol, 2002, 44:259-272.

[13] Kimura H, Morishima T, Kanegane H, Ohga S, Hoshino Y, Mae-
da A, et al. Prognostic factors for chronic active Epstein-Barr virus
infection[J]. J Infect Dis, 2003, 187(4):527-533.

[14] Yamashita N, Kimura H, Morishima T. Virological aspects of Ep-
stein-Barr virus infections[J]. Acta Med Okayama, 2005, 59
(6):239-246.

[15] Okan M. Overview and problematic standpoints of severe chronic
active Epstein-Barr virus infection syndrome[J]. Crit Rev Oncol
Hematol, 2002, 44:273-282.

[16] Ryan JL, Fan H, Swinnen LJ, Schichman SA, Raab-Traub N,
Covington M, et al. Epstein-Barr virus (EBV) DNA in plasma is
not encapsidated in patients with EBV-related malignancies[J].
Diagn Mol Pathol, 2004, 13(2):61-68.

(本文编辑:徐福兰)